骨格筋肥大・萎縮の制御に長寿遺伝子はどのように関わるのか

豊橋創造大学大学院　江川達郎
（共同研究者）同　後藤勝正
同　後藤亜由美
同　大野善隆
京都大学大学院　林達也

How Do Longevity-related Genes Regulate Skeletal Muscle Hypertrophy and Atrophy?

by

Tatsuro Egawa, Katsumasa Goto, Ayumi Goto
Graduate School of Health Sciences,
Toyohashi SOZO University
Yoshitaka Ohno
School of Health Sciences,
Toyohashi SOZO University
Tatsuya Hayashi
Graduate School of Human and Environmental Studies,
Kyoto University

ABSTRACT

5'AMP-activated protein kinase（AMPK）is one of longevity-related genes, which promotes health and wellbeing by regulating glucose, lipid, and energy metabolisms. Recently, it has been revealed that AMPK is also associated with regulating skeletal muscle mass. However, the precise mechanism of AMPK-mediated regulation of

muscle mass is not fully clarified. In the present study, we examined mechanisms by which AMPK coordinates muscle mass. Wild type mice (WT) and muscle-specific AMPK inactivated mice (AMPK-DN) were used in this experiment, and soleus muscle atrophy was induced by 2-week hindlimb suspension. Soleus muscle atrophy was greater in WT group than AMPK-DN group. In WT group, mRNA of muscle-Ring finger 1, which promotes protein degradation in muscle, was upregulated, but not in AMPK-DN group. In addition, Akt/mammalian target of rapamycin/p70 s6 kinase pathway, which promotes protein synthesis in muscle, is activated more in AMPK-DN group compared with WT group. In conclusion, a longevity-related gene, AMPK negatively regulates skeletal muscle mass through upregulating protein synthesis pathways and downregulating protein degradation pathways.

要　旨

5'AMP-activated protein kinase（AMPK）は糖・脂質・エネルギー代謝を調節して健康増進をもたらす長寿関連遺伝子の１つであるが，骨格筋量の調節に関与することも示唆されている．本研究ではAMPKが骨格筋量を制御するメカニズムについて，骨格筋AMPKを特異的に不活性化したマウスを用いて検討した．野生型マウス（WT）と骨格筋特異的AMPK不活性化マウス（AMPK-DN）に対し，２週間の後肢懸垂処置によるヒラメ筋への負荷除去および後肢懸垂後に１および２週間の通常飼育による再荷重を行ったところ，AMPK-DNはWTに比べて筋萎縮の程度が軽減された．WTではタンパク質分解を促進するmuscle Ring-finger 1のmRNA発現が増加したが，AMPK-DNでは変化がなかった．また，タンパク質合成を促進するAkt/p70 s6 kinase経路はAMPK-DNにおいてWTに比べてより活性化していた．以上より，長寿関連遺伝子AMPKはタンパク質合成・分解を調節して，骨格筋量を負に制御することが明らかになった．

緒　言

骨格筋は体内最大の器官であり全身の代謝バランスを調節する重要な臓器として健康増進に不可欠である．骨格筋量の減少は２型糖尿病などの代謝関連疾患の発症リスクを高めるだけでなく，加齢性筋減弱症（サルコペニア）やロコモティブシンドロームなどの運動器疾患を誘発する．現在のところ，骨格筋量を調節するメカニズムについては明確となっていないため，骨格筋量を調節するメカニズムを明らかにし，骨格筋量の減少を改善・予防するための方策を確立することは，健康寿命を延伸させることにおいて極めて重要な課題である．

近年，長寿関連遺伝子を活性化することが，寿命延長や老化抑制につながるとして注目を浴びている．長寿関連遺伝子には代表的なものとしてSIRT1やCircadian Locomotor Output Cycles Kaput（CLOCK），5'AMP-activated protein kinase（AMPK）が存在している．なかでもAMPKはCLOCK[12]やSIRT1[4]の制御に関与しており，AMPKが長寿関連遺伝子群の中でもマスターレギュレーターとしての役割を担っているものと考えられる．

骨格筋AMPKは運動（筋収縮）や飢餓，低酸素などの代謝的ストレスによって活性化し，インスリン感受性亢進，インスリン非依存的糖輸送促進，脂肪酸酸化，グリコーゲンやタンパク質代謝制御，peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α（PGC1α）を介したミトコンドリア機能の亢進，筋代謝特性の遅筋化など，抗肥満，抗糖尿病的に作用する多様な効果の発現に寄与することが示唆されている[9,10,22]．一方で，AMPKの活性化はタンパク質合成を阻害し骨格筋量の減少を助長する可能性が示唆されている[2,17]．つまり，長寿関連遺伝子であるAMPKの活性化は骨格筋の質を高める一方で，量的な面では負の影響をもたらす可能性が考えられる．しかしAMPKを中心とした長寿関連遺伝子が，骨格筋量の制御においてどのような役割を担っているのかについては明確となっていない．したがって，これら長寿関連遺伝子を活性化させることが，果たして骨格筋にとって望ましいことであるのかについては疑問の余地が残る．

そこで本研究では，AMPKに焦点を当て，AMPKの活性化が骨格筋の量的変化に影響をおよぼすのかについて，AMPK活性を低下させた遺伝子組換えマウスと野生型マウスを比較検討することにより，長寿関連遺伝子の活性化が骨格筋の機能維持にもつ意義を明らかにしていく．

1．方　法

1．1　実験対象

本実験では生後12-16週齢の骨格筋特異的AMPK不活性化マウス（AMPK-DN）12匹と同腹子の野生型マウス（WT）12匹を用いた．AMPK-DN[16]は医薬基盤研実験動物研究資源バンクより入手した．全てのマウスは，温度が22±2℃に設定され，照明が12時間毎に点灯と消灯を繰り返し行う飼育室で飼育した．餌と水は自由摂取とした．本実験は豊橋創造大学が定める動物実験規定に基づき，豊橋創造大学生命倫理委員会の審査･承認を経て実施された．

1．2　処置方法

マウスを無作為に，①対照群（Pre）および②後肢懸垂群の2群に分類した．後肢懸垂群のマウスには，2週間の尾部懸垂を負荷した[15]．2週間の懸垂後に通常飼育へ戻すことで，ヒラメ筋への荷重を再開し，萎縮したヒラメ筋の再成長を惹起した．後肢懸垂終了直後（R0），後肢懸垂終了後通常飼育1週間（R1）および2週間（R2）後にマウス両後肢よりヒラメ筋を摘出した．得られたヒラメ筋は摘出後，即座に結合組織を除去したのち，筋湿重量を測定し，液体窒素を用いて急速に凍結した．

1．3　電気泳動およびウエスタンブロット法

筋サンプルにおけるタンパク質発現量の解析にはウエスタンブロット法を用いた[19,23]．各サンプルはProtease/Phosphatase Inhibitor Cocktail（5872, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA）を添加したlysis buffer（CelLytic MT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA）を用いてホモジネートし，20000gで遠心したのち上清を回収した．得られた上清中のタンパク質（10μg）を7.5%のアクリルアミドゲルを用いて電気泳動・分離（SDS-PAGE）し，polyvinylidene difluoride（PVDF）メンブレン（Hybond-P, GE HealthCare, Buckinghamshire, UK）に転写した．このメンブレンをBlocking One-P（Nakarai Tesque, Kyoto, Japan）で1時間ブロッキングし，その後tris-buffered saline（TBS-T, pH 7.6）で10000倍希釈したAMPKα1抗体（07-350, Millipore, Billerica, MA, USA）またはphospho-acetyl CoA carboxylase（ACC）Ser[79]抗体（3661, Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA），β-actin抗体（4967, Cell Signaling Technology），

phospho-Akt Ser^{473} 抗　体（9271, Cell Signaling Technology），phospho-p70 s6 kinase（p70S6K）Thr^{389} 抗体（9206, Cell Signaling Technology）溶液にて4℃で一晩インキュベートした．このメンブレンを洗浄し，TBS-T で10000倍に希釈した anti-rabbit IgG（7074, Cell Signaling Technology）と室温で1時間反応させ，これを化学発光試薬（ECL select Western Blotting Detection System, GE HealthCare）を用いて目的のタンパク質を検出した．各筋サンプルのバンドは画像解析ソフト ImageJ（National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）で定量化した．

1．4　リアルタイム RT-PCR 法

筋サンプルにおける遺伝子（mRNA）発現量の解析は，定量リアルタイム RT-PCR 法にて行った[23]．RNeasy Mini Kit（Qiagen GmbH, Hiden, Germany）を用いて，摘出した骨格筋組織から RNA を抽出した．抽出した RNA サンプルは cDNA Synthesis Kit（PrimeScript RT Master Mix for mRNA, Takara Bio, Japan）を用いて cDNA に逆転写した．合成した cDNA は Takara SYBR Premix EX Taq II を用いて，RT-PCR を行った．各遺伝子の増幅は**表1**で示したプライマーを用いて行った．内在性コントロールとして18S ribosomal protein（18S）cDNA を用い，18S に対する各遺伝子発現レベルの相対的発現量を測定した．

1．5　統計処理

すべての測定値は平均 ± 標準誤差で示した．統計処理は主効果を時間とマウス種別とした二元配置分散分析法を用い，Tukey-Kramer の多重比較検定を用いて各要因およびグループ間の比較を行った．有意水準は $P<0.05$ とした．

2．結　果

図1にウエスタンブロット法により検出した AMPKα1 および ACC Ser^{79} リン酸化，β-actin タンパク質発現の結果を示す．AMPK-DN マウスは AMPKα1 タンパク質を過剰発現した遺伝子組換えマウスであり，本研究においても AMPK-DN マウスにのみ AMPKα1 タンパク質発現が確認された．また AMPK 活性の指標である ACC Ser^{79} リン酸化タンパク質発現は AMPK-DN マウスにおいて減少しており，AMPK-DN マウスは AMPK 活性が低下していることが確認された．いずれのマウス，処置においても β-actin タンパク質発現量に変化はなかった．

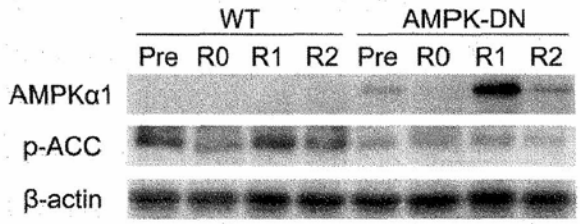

図1　AMPKα1 および ACC Ser79 リン酸化（p-ACC），β-actin タンパク質発現量の変化

図2に体重および筋湿重量，体重あたりの筋湿重量の変化を示す．体重は WT マウスおよび AMPK-DN マウスの両群ともに後肢懸垂により減少し，後肢懸垂後1週間の通常飼育で回復した．また筋重量の変化も同様であった．一方，体重あたりの筋湿重量は後肢懸垂で減少し，通常飼育1週間で回復したが，AMPK-DN マウスが WT マ

表1　本実験で使用したプライマー配列一覧

Primer	Forward	Reverse
18S	5'-ACTCAACACGGGAAACCTCA-3'	5'-AACCAGACAAATCGCTCCAC-3'
MuRF1	5'-AGGACTCCTGCAGAGTGACCAA-3'	5'-TTCTCGTCCAGGATGGCGTA-3'
atrogin-1	5'-TGTCCTTGAATTCAGCAAGCAAAC-3'	5'-TGTGGCCATCCATTATTTCCAG-3'

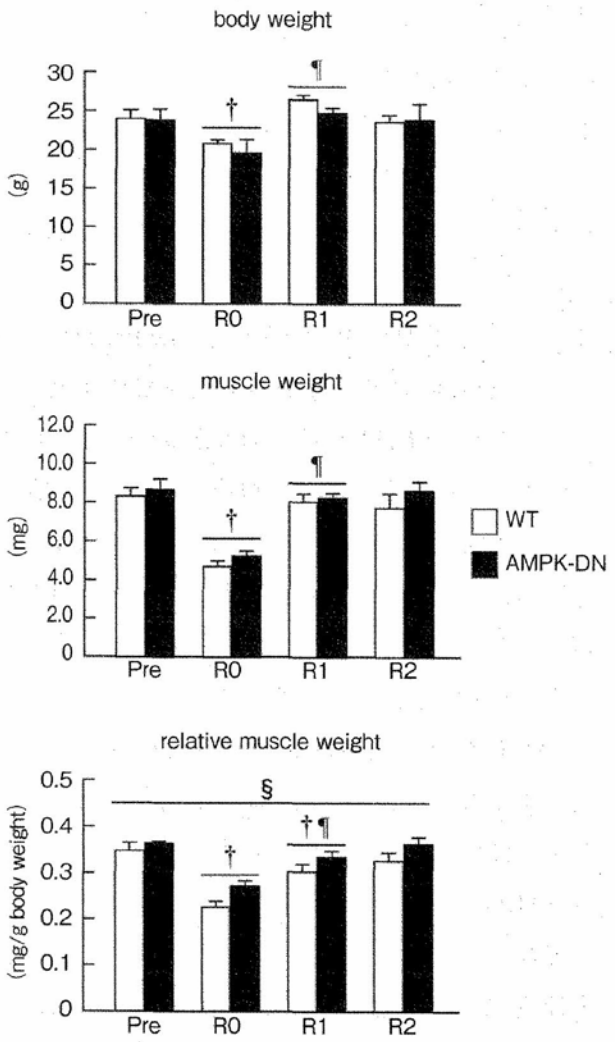

図2　体重および筋湿重量，体重あたりの筋湿重量の変化
Pre: 対照群，R0: 後肢懸垂2週間群，R1: 後肢懸垂2週間後に通常飼育1週間群，R2: 後肢懸垂2週間後に通常飼育2週間群を示す
† and ¶: significant effects versus Pre and R0, respectively
§: significant different between WT and AMPK-DN
n=3/group

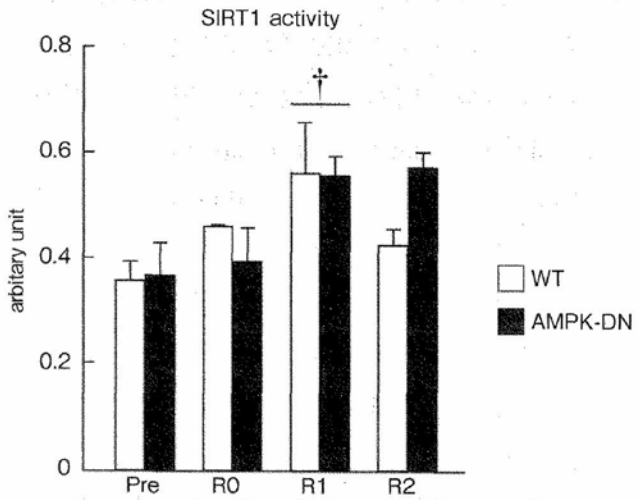

図3　SIRT1活性の変化
†: significant effects versus Pre

ウスより有意に高値を示した．

図3にSIRT1活性の結果を示す．SIRT1活性はWTマウスとAMPK-DNマウスの両群に差はなく，対照群に対し後肢懸垂後1週間の通常飼育した群で活性が上昇した．

図4にタンパク質合成シグナルの制御因子であるAkt Ser^{473}リン酸化およびp70S6K Thr^{389}リン酸化タンパク質の発現の結果を示す．Akt Ser^{473}リン酸化は後肢懸垂後1週間および2週間の通常飼育により促進した．またWTマウスに比べてAMPK-DNマウスのAkt Ser^{473}リン酸化がより高値を示した．p70S6K Thr^{389}リン酸化は後肢懸垂後1週間の通常飼育により促進したが，WTマウスとAMPK-DNマウスに差は認められなかった．

図5にタンパク質分解の制御因子であるMuRF1とatrogin-1のmRNA発現の結果を示す．

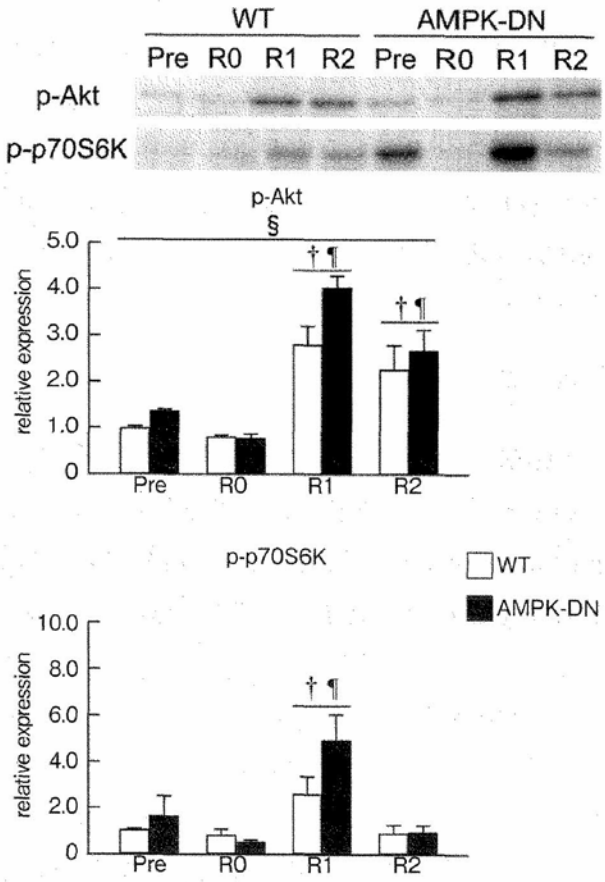

図　4　Akt Ser^{473}リン酸化(p-Akt)およびp70S6K Thr^{389}リン酸化(p-p70S6K)タンパク質発現量の変化
† and ¶: significant effects versus Pre and R0, respectively
§: significant different between WT and AMPK-DN

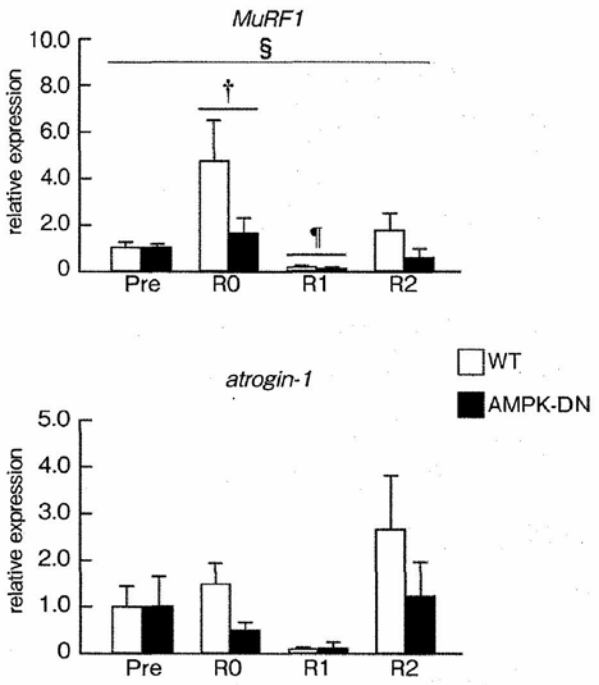

図5　MuRF1およびatrogin-1 mRNA発現量の変化
† and ¶: significant effects versus Pre and R0, respectively
§: significant different between WT and AMPK-DN

MuRF1 mRNA発現は後肢懸垂処置により増加し，後肢懸垂後1週間の通常飼育を行うことにより顕著に減少した．またAMPK-DNマウスの方がWTマウスに比べ低値を示した．atrogin-1 mRNA発現はMuRF-1と同様の傾向を示したが，有意な変化は認められなかった．

考　察

AMPKは運動によって活性化され，骨格筋においてインスリン非依存的に糖を取り込んだり，脂肪酸を取り込んで燃焼させる作用を有することから発見され[11]，運動による健康増進効果の中心分子として注目されるようになった．以後，カロリー制限やレスベラトロールカフェインなどの植物成分によってもAMPKが活性化することがわかり[1,5,6,7,24]，さらにはAMPKはSIRT1を活性化し，ミトコンドリア生合成に重要なPGC1-αを活性化することからも，長寿に寄与する分子として考えられている[3,4]．しかしながら本研究においては，興味深いことにAMPK-DNマウスでは野生型マウスと比較してSIRT1活性に違いは認められなかった（図3）．AMPK活性化によりNAD$^+$が増加して，NAD$^+$依存性脱アセチル化酵素であるSIRT1が活性化されることが明らかになっている[4]．本研究では筋中のNAD$^+$濃度は測定していないが，NAD$^+$のエネルギー代謝における重要性を考えると，AMPK-DNマウスではAMPK以外の分子によりNAD$^+$濃度が一定に保たれ，SIRT1活性に影響がなかったものと推測される．一方，後肢懸垂後1週間の通常飼育によりSIRT1活性が上昇したが，これは萎縮した筋肉に荷重負荷がかかることで，一種の運動負荷状態になりSIRT1活性化につながったものと考えられる．

AMPKの活性化はタンパク質合成シグナルを阻害することや筋の分化，肥大を抑制することが明らかになっており[2,17]，長寿をもたらすとされるAMPKの活性化は，筋の肥大を抑制するばかりでなく筋萎縮を助長する可能性が考えられる．本研究においても，AMPK活性が低下したマウスでは，後肢懸垂に伴うヒラメ筋の萎縮が軽減された（図2）．これはAMPKが骨格筋量を負に調節していることを意味しており，AMPK活性が低い方が筋肥大の促進や筋萎縮の抑制に有利であることを示すものである．

骨格筋の量的変化はタンパク質の合成と分解のバランスによって調節されている．骨格筋タンパク質合成に関わる重要なシグナル伝達経路にはAkt/mammalian target of rapamycin（mTOR）/p70S6K経路がある[8,21]．Akt/mTOR/p70S6K経路の活性化は筋肥大を促進し，筋萎縮を抑制することが明らかになっている．これまでに，AMPK活性化はmTOR/p70S6K経路を阻害することが知られており，AMPKをノックダウンしたマウスでは，mTOR/p70S6K経路を活性化することにより機械的過負荷に伴う筋肥大を促進することがわかっている[13,18]．本研究においては，後肢懸垂

後1週間の通常飼育によりAkt/mTOR/p70S6K経路が活性化することが示された（図4）．しかしながら，後肢懸垂直後のAktおよびp70S6K活性にはAMPK-DNマウスと野生型マウスでは違いはなかった．したがって，AMPK-DNマウスにおいて後肢懸垂時の筋萎縮軽減にはAkt/mTOR/p70S6K経路を介したタンパク質合成は関与していないと考えられる．

筋タンパク質分解にはユビキチン－プロテアソーム系が重要な役割を担っており，特にユビキチンリガーゼであるMuRF1やatrogin-1の発現増加は筋萎縮を惹起する[8,14,20]．我々は骨格筋培養細胞を用いた検討により，AMPKの活性化がMuRF1やatrogin-1発現の増加を介して筋肥大を抑制することを明らかにしている（data not shown）．したがって，AMPKの活性低下はこれらユビキチンリガーゼの発現を抑制し筋萎縮を抑制することが推察される．本研究の結果においても，後肢懸垂直後のMuRF1遺伝子発現の増加は，野生型マウスで顕著に起きたが，AMPK-DNマウスでは発現増加は認められなかった（図5）．つまり，AMPK-DNマウスにおける後肢懸垂時の筋萎縮軽減にはユビキチンリガーゼ発現低下を介したタンパク質分解の抑制が関与しているものと考えられる．

本研究はAMPK活性が低下したAMPK-DNマウスを用いて，AMPKが骨格筋量制御に持つ役割について検討を行った．その結果，以下の3点のことが新たに明らかになった．

1）AMPK活性が低下した状態では正常状態に比べて，後肢懸垂に伴うヒラメ筋の萎縮が軽減する，2）AMPK活性が低下した状態における筋萎縮の軽減には，タンパク質合成シグナルは関与しない，3）AMPK活性が低下した状態における筋萎縮の軽減には，タンパク質分解シグナルの減弱が関与する．以上のように，AMPKは後肢懸垂に伴う骨格筋量の変化に関与すること，そしてそのメカニズムの一端としてユビキチンリガーゼ発現を抑制して，タンパク質分解を抑制することが明らかになった．一方，AMPK活性が低下した状態においても，SIRT1活性は変化していないことから，AMPKを介した骨格筋量調節にはSIRT1は関与していないと考えられる．

4．総　括

本研究により，長寿をもたらすとされるAMPKが骨格筋量を負に調節していることが明らかになった．昨今，AMPKを薬物や生薬，植物，食品成分などで積極的に活性化することが健康増進につながると考えられているが，本研究で明らかになったように，AMPKを過度に活性化することは骨格筋量の減少を招くことにもなりかねない．健康長寿を達成するうえで，骨格筋の代謝機能を維持することは大切であるが，骨格筋の量を維持することも極めて重要なことである．筆者らは，AMPKを中心とした長寿関連遺伝子を安易にそして“過度”に活性化させることは，筋量の減少を招いて不健康状態を招きかねないと考えている．今後，AMPKを含めた長寿関連遺伝子による健康増進効果を解き明かすうえで，骨格筋の質的のみならず量的側面への影響も考慮していくことが必要になってくるであろう．

謝　辞

本研究を遂行するにあたり，助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く御礼申し上げます．また実験補助としてご協力いただきました弘前学院大学研究員の唐柳林先生に深く感謝いたします．

文　献

1）Baur J.A., Pearson K.J., Price N.L., Jamieson H.A., Lerin C., Kalra A., Prabhu V.V., Allard J.S., Lopez-Lluch G., Lewis K., Pistell P.J., Poosala S., Becker

K.G., Boss O., Gwinn D., Wang M., Ramaswamy S., Fishbein K.W., Spencer R.G., Lakatta E.G., Le Couteur D., Shaw R.J., Navas P., Puigserver P., Ingram D.K., de Cabo R., and Sinclair D.A. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444: 337-342, (2006)

2) Bolster D.R., Crozier S.J., Kimball S.R., and Jefferson L.S. AMP-activated protein kinase suppresses protein synthesis in rat skeletal muscle through down-regulated mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *J. Biol. Chem.*, 277: 23977-23980, (2002)
3) Canto C. and Auwerx J. Calorie restriction: is AMPK a key sensor and effector? *Physiology (Bethesda)* 26: 214-224, (2011)
4) Canto C., Gerhart-Hines Z., Feige J.N., Lagouge M., Noriega L., Milne J.C., Elliott P.J., Puigserver P., and Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD+ metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458: 1056-1060, (2009)
5) Egawa T., Hamada T., Kameda N., Karaike K., Ma X., Masuda S., Iwanaka N., and Hayashi T. Caffeine acutely activates 5'adenosine monophosphate-activated protein kinase and increases insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscles. *Metabolism*, 58: 1609-1617, (2009)
6) Egawa T., Hamada T., Ma X., Karaike K., Kameda N., Masuda S., Iwanaka N., and Hayashi T. Caffeine activates preferentially alpha1-isoform of 5'AMP-activated protein kinase in rat skeletal muscle. *Acta. Physiol.*, (Oxf) 201: 227-238, (2011)
7) Fulco M., Cen Y., Zhao P., Hoffman E.P., McBurney M.W., Sauve A.A., and Sartorelli V. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Developmental cell*, 14: 661-673, (2008)
8) Glass D.J. Signalling pathways that mediate skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Nat. Cell. Biol.*, 5: 87-90, (2003)
9) Hardie D.G. Energy sensing by the AMP-activated protein kinase and its effects on muscle metabolism. *Proc. Nutr. Soc.*, 70: 92-99, (2011)
10) Hayashi T., Hirshman M.F., Fujii N., Habinowski S.A., Witters L.A., and Goodyear L.J. Metabolic stress and altered glucose transport: activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes*, 49: 527-531, (2000)
11) Hayashi T., Hirshman M.F., Kurth E.J., Winder W.W., and Goodyear L.J. Evidence for 5' AMP-activated protein kinase mediation of the effect of muscle contraction on glucose transport. *Diabetes*, 47: 1369-1373, (1998)
12) Lamia K.A., Sachdeva U.M., DiTacchio L., Williams E.C., Alvarez J.G., Egan D.F., Vasquez D.S., Juguilon H., Panda S., Shaw R.J., Thompson C.B., and Evans R.M. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science*, 326: 437-440, (2009)
13) Lantier L., Mounier R., Leclerc J., Pende M., Foretz M., and Viollet B. Coordinated maintenance of muscle cell size control by AMP-activated protein kinase. *FASEB J.*, 24: 3555-3561, (2010)
14) Lecker S.H., Jagoe R.T., Gilbert A., Gomes M., Baracos V., Bailey J., Price S.R., Mitch W.E., and Goldberg A.L. Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *Faseb J.*, 18: 39-51, (2004)
15) Matsuba Y., Goto K., Morioka S., Naito T., Akema T., Hashimoto N., Sugiura T., Ohira Y., Beppu M., and Yoshioka T. Gravitational unloading inhibits the regenerative potential of atrophied soleus muscle in mice. *Acta. Physiol.*, (Oxf) 196: 329-339, (2009)
16) Miura S., Kai Y., Kamei Y., Bruce C.R., Kubota N., Febbraio M.A., Kadowaki T., and Ezaki O. Alpha2-AMPK activity is not essential for an increase in fatty acid oxidation during low-intensity exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 296: E47-55, (2009)
17) Mounier R., Lantier L., Leclerc J., Sotiropoulos A., Foretz M., and Viollet B. Antagonistic control of muscle cell size by AMPK and mTORC1. *Cell. cycle.*, 10: 2640-2646, (2011)
18) Mounier R., Lantier L., Leclerc J., Sotiropoulos A., Pende M., Daegelen D., Sakamoto K., Foretz M., and Viollet B. Important role for AMPKalpha1 in limiting skeletal muscle cell hypertrophy. *Faseb J.*, 23: 2264-2273, (2009)
19) Ohno Y., Yamada S., Sugiura T., Ohira Y., Yoshioka T., and Goto K. Possible role of NF-kB signals in heat stress-associated increase in protein content of cultured C2C12 cells. *Cells Tissues Organs*, 194: 363-370, (2011)
20) Senf S.M., Dodd S.L., and Judge A.R. FOXO

signaling is required for disuse muscle atrophy and is directly regulated by Hsp70. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **298**: C38-45, (2010)

21) Stitt T.N., Drujan D., Clarke B.A., Panaro F., Timofeyva Y., Kline W.O., Gonzalez M., Yancopoulos G.D., and Glass D.J. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol. Cell.*, **14**: 395-403, (2004)

22) Witczak C.A., Sharoff C.G., and Goodyear L.J. AMP-activated protein kinase in skeletal muscle: from structure and localization to its role as a master regulator of cellular metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**: 3737-3755, (2008)

23) Yasuhara K., Ohno Y., Kojima A., Uehara K., Beppu M., Sugiura T., Fujimoto M., Nakai A., Ohira Y., Yoshioka T., and Goto K. Absence of heat shock transcription factor 1 retards the regrowth of atrophied soleus muscle in mice. *J. Appl. Physiol.*, **111**: 1142-1149, (2011)

24) Zang M., Xu S., Maitland-Toolan K.A., Zuccollo A., Hou X., Jiang B., Wierzbicki M., Verbeuren T.J., and Cohen R.A. Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*, **55**: 2180-2191, (2006)